

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

E

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01262470 A**

(43) Date of publication of application: **19 . 10 . 89**

(51) Int. Cl

G01N 33/52

(21) Application number: **63089879**

(22) Date of filing: **12 . 04 . 88**

(71) Applicant: **FUJI PHOTO FILM CO LTD**

(72) Inventor: **TANAKA MITSUTOSHI
ARAI TAKANOBU**

(54) **DRY PROCESS WHOLE BLOOD ANALYSING
ELEMENT**

(57) Abstract:

PURPOSE: To enhance the accuracy of a quantitative analysis by providing at least two water permeable layers including a reagent layer and porous development layer and incorporating sodium chloride or potassium chloride of a specific range into the porous development layer.

CONSTITUTION: At least the water permeable reagent

layer and porous development layer are provided to the title element and the sodium chloride or potassium chloride is incorporated in a 5W60g/m² range into the porous development layer formed of a fibrous or nonfibrous material. The disturbance by the red blood cells in whole blood is averted in the analyzing element and the diffusion of the components to be inspected in the blood plasma to the reagent layer is rapidly effected. The analysis is, therefore, executed with high accuracy regardless of the hematocrit value of the blood.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

1. The first part of the document is a title page. It contains the title of the document, the author's name, and the date of the document. The title is "The first part of the document is a title page. It contains the title of the document, the author's name, and the date of the document." The author's name is "The author's name is the name of the person who wrote the document." The date of the document is "The date of the document is the date when the document was written." The title page is the first page of the document. It is the page that you see when you first open the document. It is the page that you see when you first open the document.

2. The second part of the document is a table of contents. It contains a list of the sections of the document and the page numbers where each section begins. The table of contents is the second page of the document. It is the page that you see when you first open the document. It is the page that you see when you first open the document.

3. The third part of the document is the main body of the document. It contains the text of the document. The main body of the document is the third page of the document. It is the page that you see when you first open the document. It is the page that you see when you first open the document.

4. The fourth part of the document is a conclusion. It contains the conclusion of the document. The conclusion is the fourth page of the document. It is the page that you see when you first open the document. It is the page that you see when you first open the document.

5. The fifth part of the document is a bibliography. It contains a list of the sources that were used in the document. The bibliography is the fifth page of the document. It is the page that you see when you first open the document. It is the page that you see when you first open the document.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑫ 公開特許公報(A) 平1-262470

⑮ Int. Cl.⁴

G 01 N 33/52

識別記号

庁内整理番号

B-7055-2G

⑬ 公開 平成1年(1989)10月19日

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全7頁)

⑭ 発明の名称 乾式全血分析要素

⑯ 特 願 昭63-89879

⑰ 出 願 昭63(1988)4月12日

⑱ 発 明 者 田 中 光 利 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内

⑲ 発 明 者 新 井 貴 喜 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内

⑳ 出 願 人 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地

明細書

1. 発明の名称

乾式全血分析要素

2. 特許請求の範囲

(1) 少なくとも2つの水浸透性層を有し、水浸透性層は試薬層と多孔質膜層を包含し、試薬層は多孔質膜層の液体を受容する面と反対側に設けられており、被検成分の存在下に光学的に検出し得る物質を生成し得る試薬組成物を、前記水浸透性層の少なくとも一つに含む、赤血球を含む血液中の特定成分を定量分析するに用いる乾式多層分析要素であって、

前記多孔質膜層に少なくとも5 g/m²の塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含むことを特徴とする分析要素。

(2) 多孔質膜層に20ないし60 g/m²の塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含む特許請求の範囲(1)の分析要素。

(3) 赤血球を25体積%以上含む血液の分析に用いる特許請求の範囲(1)の分析要素。

(4) 血液中の疎水性でない成分の定量に用いる特許請求の範囲(1)の分析要素。

(5) 血液中の糖類の定量に用いる特許請求の範囲(1)の分析要素。

(6) 血液中のグルコースの定量に用いる特許請求の範囲(1)の分析要素。

(7) 少なくとも2つの水浸透性層を水不浸透性透明支持体の上に有する特許請求の範囲(1)の分析要素。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、血液中の特定物質を定量分析するに用いる乾式化学分析要素に関する。

〔従来技術とその欠点〕

体液中に存在する各種の代謝成分、例えばグルコース、ビリルビン、尿酸、コレステロール、乳酸脱水素酵素、クレアチンキナーゼ、GOT、GPT等の定量分析は、臨床医学上重要で、疾患の診断、治療経過の追跡、予後の判定などに不可欠である。血液等を試料とする臨床化学検査では、

微量の液体試料で、精度の高い検査を行うことができることが望ましい。従来、溶液試薬を用いる湿式法が広く用いられているが、迅速性に欠ける。

乾式化学分析、すなわち実質的に乾燥状態の分析要素、例えば、試験片や多層分析要素中に、分析試薬系を導入した臨床分析法が知られている。乾式化学分析は湿式法による化学分析（即ち、溶液中に試薬を用いる方法）より、例えば使用上の簡便性、経済上の節約及び分析の迅速さなどの点で優れている。乾式多層分析要素は、微量の液体試料で、精度の高い検査を迅速に行うことができる分析手段として、開発された。乾式多層分析要素は例えば、特公昭 53-21677 号、特開昭 55-184358 号、特開昭 60-222789 号等で知られている。

乾式多層分析要素の一例を挙げれば、透明支持体、試薬層、反射層、展開層から構成されている。透明支持体（例えば下塗り処理を施した厚いプラスチックフィルム）の上に塗布された試薬層には、血液の成分から赤血球を分離する操作には多くの努力を要する。液体試料中に含まれる被検成分と反応し、その成分と装置のコストを伴うので、未希釈の全血で分析に好適な光学的濃度に発色する試薬が含まれる。

反射層は、試薬層に入射した光が展開層に達するのを防ぎ、試薬層の光学測定の際展開層に点した液体試料の影響を受けないようにする役割を持つ。展開層は、点着された液体試料を均一に、液の量にほぼ比例する面積に広げる。このような乾式分析要素を用いて定量分析するには、液体試料、例えば全血を試薬層の表面に一定量滴下する。展開層で展開された血液は、反射層を通過して試薬層に達し、ここで試薬と反応し、発色する。点着後、化学分析スライドを適当な時間、一定温度に保って発色反応を十分に進行させた後、透明支持体側から照明光を試薬層に照射し、特定波長域で反射光量を測定して反射濃度を求め、予め求めておいた検量線に基づいて定量分析を行う。

従来、湿式法と乾式化学分析いずれにおいても、赤血球を除去した血清または血漿を試料として分析が行なわれることが多かった。しかし血液の他の成分から赤血球を分離する操作には多くの努力を要する。液体試料中に含まれる被検成分と反応し、その成分と装置のコストを伴うので、未希釈の全血で分析に好適な光学的濃度に発色する試薬が含まれる。

全血を試料として乾式化学分析を行うには、血液の成分、血漿中の成分含量が同じ血液でも分析結果に誤差が生じる。赤血球及び白血球及び全血の他の高分子成分の濃度により、かなり差が出る経験がなされた。

成分を、分析要素中で何らかの手段で分離しなければならぬ。特に血液のヘマトクリット値が高く、しかも被検成分の濃度が高いとき、濃度の高い被検成分を、分析要素中で分離する必要がある。この測定値が血漿中の濃度に対し負の誤差を示すことがあるため、この誤差を修正する必要がある。しかし、特開昭 60-111980 号に記載されているように、乾式分析要素に設けたろ過層により血清成分と赤血球成分を分離する場合には非常に時間がかかり、また血漿または血清中の分析物の一部がろ過層中で失われて、分析が正確に行なわれないおそれがあった。

特公昭 61-61347 号に記載された乾式分析要素は、全血中の赤血球が分析要素の上面に設けられた多孔質展開層中で血漿から分離除去され、しかも血漿中の被検成分の試薬層への拡散が速やかに行なわれ、全血試料中の特定成分の分析に適している。しかし、この多層分析要素を用いて全血の分析を行うとき、血液のヘマトクリット値（血液中に占める血球の容積百分率）の大小により、分析結果に誤差が生じる。特に血液中の被検成分（アカライト）の濃度が高いときに見られる、濃度測定値の負の誤差を防止することを、技術的課題とする。

本発明の目的は、血液のヘマトクリット値に拘わらず高い精度で分析することができる乾式分析要素の提供を、技術的課題とする。

本発明の目的は、血液のヘマトクリット値に拘わらず高い精度で分析することができる乾式分析要素の提供を、技術的課題とする。

本発明の目的は、血液のヘマトクリット値に拘わらず高い精度で分析することができる乾式分析要素の提供を、技術的課題とする。

質的に感ぜしめないような層を言い、調節しやすい。親水性ポリマーにより構成することができる。

上記(6)ないし(7)において第一試薬層と底開層の間、第二試薬層と第一試薬層の間、または光反射層と第一もしくは第二試薬層の間に、蛋白質阻止層を設けてもよい。

水不浸透性透明支持体の材料として好ましいものは、ポリエチレンテレフタレートである。セルローストリアセテート等のセルロースエステル類でもよい。親水性層を強固に接着させるため通常、下塗り層を設けるが、親水化処理を施す。

試薬組成物には、被検成分の存在下に、光学的に検出し得る物質、例えば染料を生成し得る組成物を含む。ロイコ色素の酸化によつて染料を生成する組成物(例として、米国特許 4,089,747号、特開昭59-193352号等に記載されたようなアリール系ロイミダゾールロイコ色素)、ジアゾニウム塩、酸化されたときに他の化合物とカップリングによつて染料を生成する化合物を含む組成物(例えば4-アミノアンチピリン類と、フェノール類またはナフトール類)、還元型補酵素と電子伝達剤の存在下で染料を生成することのできる化合物から成るもの等を用いることができる。また、酵素活性を測定する分析要素の場合には、例えばp-ニトロフェノールのような有色物質を遊離しうる自己顕色性基質を、試薬層や底開層に含むことができる。

試薬組成物は、総てを一つの水浸透性層、例えば試薬層に含んでもよく、別の層に分けて含有させてもよい。例えば被検成分と試薬との反応により中間体を生成する組成物を試薬層に、中間体と反応して染料等を生成し得る組成物(指示薬)を試薬層と支持体との間にある第2の試薬層に含んでもよい。中間体を生成する組成物を血球ろ過層または光反射層に、指示薬を試薬層に含んでもよい。

第1の試薬層と第2の試薬層の間に、気体透過層、妨害物除去層(例えば米国特許4,088,403号=特公昭58-19062号のように)を設けてもよく、これらの層は必要なら水不浸透性であってもよい。

試薬組成物は、一部または全部を、親水性ポリマーを結合剤とする実質的に均一な層に含ませて

もよい。親水性ポリマーとして例えば、ゼラチン、デンプン、粒子、けい酸土等が親水性または非親水性ポリマー。およびこれらの胡麻体(例えばアクリル化ゼラチン)に、重合で結合された連続空隙をもつ多孔性層も利用できる。

セルロース誘導体(例えばヒドロキシエチルセルロース)、アガロース、アクリルアミド重合体、メタアクリルアミド重合体、アクリルアミドまたはメタアクリルアミドと各種ビニル性モノマーとの共重合体等が利用できる。

試薬組成物の一部または全部を、多孔性層に含んでもよい。試薬層として、ろ紙、不織布のような多孔性層を用いてもよいが、非繊維多孔性層(例えば下塗り層、接着層、吸水層)の上に前記多孔性層を用いることもできる。非繊維多孔性層として、特開昭55-184356号のような方法で接着させた

ては、特公昭53-21877号、米国特許1,421,341号、特開昭55-184356号に記載されたセルロースエステル類、例えばセルロースアセテート、セルロースアセテート/ブタレート、硝酸セルロースからなるブラッシュ状物、または塗布するには公知の方法を利用できる。積層シユ・ポリマーの層は好ましい。特開昭62-27006号および特開昭63-10452号に記載されたポリスルホンから成る多孔性膜も好適である。その他、特公昭53-21877号、特開昭55-90859号に記載されたポリマー小粒子、ガラス

多孔性層に試薬組成物またはその一部分を含浸させ、または塗布するには公知の方法を利用できる。積層シユ・ポリマーの層は好ましい。特開昭62-27006号および特開昭63-10452号に記載されたポリスルホンから成る多孔性膜も好適である。その他、特公昭53-21877号、特開昭55-90859号に記載されたポリマー小粒子、ガラス

多孔性層に試薬組成物またはその一部分を含浸させ、または塗布するには公知の方法を利用できる。積層シユ・ポリマーの層は好ましい。特開昭62-27006号および特開昭63-10452号に記載されたポリスルホンから成る多孔性膜も好適である。その他、特公昭53-21877号、特開昭55-90859号に記載されたポリマー小粒子、ガラス

多孔性層に試薬組成物またはその一部分を含浸させ、または塗布するには公知の方法を利用できる。積層シユ・ポリマーの層は好ましい。特開昭62-27006号および特開昭63-10452号に記載されたポリスルホンから成る多孔性膜も好適である。その他、特公昭53-21877号、特開昭55-90859号に記載されたポリマー小粒子、ガラス

変化を検出する形式でも、反応途上の発色等の速度から反応速度を測定する形式でも、どちらでもよい。

分光反射濃度測定には公知の適当な装置、例えば、米国特許4,488,810号、4,584,275号、特開昭 61-294387号、同 61-294388号、同 62-184335号、同 62-184336号、同 62-198736号、同 62-245141号から245143号まで、特開昭 61-25582号、同 61-25583号、同 61-109402号、同 61-144258号、同 61-185471号、同 61-185472号、同 61-207044号から207049号まで等に記載された装置、

「富士ドライケム1000」、「富士ドライケム2000」、「富士ドライケム5000」アナライザー(いずれも富士写真フイルム株式会社製)、「Ektachem 400」、「Ektachem 700」、「Ektachem DT-80」アナライザー(いずれもイーストマン コダック カンパニー製)等を用いることができる。

ルコース等の糖類が高濃度で含まれる場合に有用である。

【実施例1】

分析要素の作製

(1)支持体、第2試薬層

ゼラチン下塗された厚さ180 μ mの無色透明ポリエチレンテレフタレート(PET)平滑フィルムの上に下記組成物を水溶液として、下記液覆量になるよう塗布し、乾燥した(第2試薬層)。

ゼラチン	6.0 g/m ²
1,7-ジヒドロキシナフタレン	0.22 g/m ²
4-アミノ-2,3-ジメチル-1-フェニル-3-ヒラゾリン-5-オン	0.40 g/m ²

(2)第1試薬層

第2試薬層の上に下記組成物を水溶液として、下記液覆量になるよう塗布乾燥した(第1試薬層)。

ゼラチン	6.9 g/m ²
ペルオキシダーゼ	23800 UNIT/m ²

本発明の分析要素は多孔性層に抗原、抗体の少なくとも一方を含有させて、免疫学的方法による抗原または抗体の定量に用いることもできる。

【発明の効果】

本発明の分析要素は、全血を試料として、血液のヘマトクリット値が25%から70%の広い範囲にわたり、種々の液状成分についてヘマトクリット値に比較的左右されない分析値を得ることができる。特にヘマトクリット値が25%から70%の広い範囲にある全血を試料としたときに、ヘマトクリット値が40%から50%の全血の場合との差が実用的に無視できるような、測定値を得ることができる。

本発明は、全血中のグルコース、尿素、尿酸、クレアチニン等の低分子成分の定量は勿論、総蛋白、アルブミン、各種酵素等の高分子成分、ビリルビン等の蛋白質と結合した成分の定量にも適用できる。本発明は、血球内外の濃度が等しいか、血漿中の濃度が血球内の1/3ないし3倍程度であるようなアナライトの定量に適する。特に、グ

グルコースオキシダーゼ	10100 UNIT/m ²
スチレン/p-((1-メチル-1-ヒペラジノ)メチル)スチレン/ジビニルベンゼン/コポリマー	2.4 g/m ²

ポリオキシエチレン	(40 \times 10 ³ g/m ² 単位)
ニルフェノール	0.80 g/m ²

(3)光反射/遮蔽層

第1試薬層の上に下記組成物を水溶液として、下記液覆量になるように塗布、乾燥し、光反射/遮蔽層を構成した。

(光反射/遮蔽層塗布液)	
二酸化チタン	8.2 g/m ²
ゼラチン	0.81 g/m ²
ポリオキシエチレン/ニルフェノール	(40 \times 10 ³ g/m ² 単位) 0.23 g/m ²

(4)接着層

光遮蔽層の上に、下記組成物を水溶液として、下記液覆量になるように塗布、乾燥し、接着層とした。

(接着層塗布液)

ゼラチン 1.5 g/m²
 ポリオキシエチレン (40 1334329単位)
 ノニルフェノール 0.22 g/m²
 酢酸カルシウム 0.52 g/m²

(5)展開層

次に接着層の全面に約30 g/m²の割合で4.5℃
 の下記組成物を与えて浸潤させた後、ポリエス
 テル系よりなるトリコット織物布を密着させ、ラミ
 ネートロールを通し、乾燥した。

水 97.8 g
 N-(ピロリジノクロロメチル)ピロリジニウム-
 β-ナフタレンスルホン酸 2.0 g
 ポリオキシエチレン (40 1334329単位)
 ノニルフェノール 0.2 g

その後、織物布の上に塩化ナトリウムを14%
 水溶液として液量4.2 g/m²になるよう塗布、乾
 燥し、グルコース定量用分析要素[1]を完成した。
 比較のため、布への上記塗布を省いたものも作
 製し、分析要素[2]とした。

全血中グルコース分析

ヒトより採血した新鮮全血にグルコース濃度が
 540 mg/dlになるようにグルコースを必要量添
 加し、室温で30分放置後、一部を遠心分離して
 得た血球と血漿を適宜混合して、ヘマトクリット
 値が15、25、40、55%の全血を用意した。

それらの正確なグルコース量はグルコース電極法
 を用いて測定した。上で作製した分析要素[1]
 および[2]の展開層上にそれぞれ4種の全血を各
 1.0 μl点着し、37℃で6分間、インキューベ
 ーションした後、中心波長540 nmの可視光で支持
 体側から反射測光により、分析要素の反射光半濃
 度を測定した。ヘマトクリット値40%の全血に
 種々の量のグルコースを添加した基準血により各
 分析要素について予め作成した検量線を用いて、
 4種の試料血のグルコース濃度を測定した。結果
 を第1表に示す。

第1表

ヘマトクリット値(%)	15	25	40	55
グルコース濃度 (mg/dl)				
分析要素[1]	529	518	540	551
分析要素[2]	583	558	540	488

第1表から明らかなように、本発明による分析要素
 [1]は、比較用分析要素[2]に比しヘマトクリット値
 の影響が格段に少なく、ヘマトクリット40%未満あ
 るいは50%を超える全血についても、ヘマトクリッ
 ト40%の全血とほぼ同じか極めて近いグルコース濃
 度測定値を与える。

【実施例2】

実施例1の、4-アミノ-2,3-ジメチル-1-フェニル-3-
 ピラゾリン-5-オン (0.40 g/m²)の代わりに 4-アミノ-
 2-メチル-3-フェニル-1-(2,4,6-トリクロロフェニル)-
 3-ピラゾリン-5-オン (0.40 g/m²)を用いた他は、実施
 例1と同様にして、分析要素を作製した。



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. 08/123,456

Inventor: John Doe

Attorney: Jane Smith

Serial No. 12345

Class: 370/330

Filed: 12/15/99

Priority: 09/123,456

Pub. No. 12345

Abstract: This invention relates to a method of...



THIS PAGE BLANK (USPTO)

...the method of the present invention...